

1/1 - (C) WPI / DERWENT

AN - 1966-18957F [00]

CPY - KYOW

DC - B00

FS - CPI

MC - B04-B03

M0 - [01] V762 B615 B701 B713 D931 D932 F113 L810 H121 H201 H422 H423 H424
J521 J522 N130 M411 M900

PA - (KYOW) KYOWA FERMENT IND LTD

PN - JP40024515B B 00000000 DW196800 000pp

PR - JP19610043382 19611204

AB - J65024515 Preparation of 5'-nucleotides by cultivating phosphatase
negative (or weak) mutant strains of 5'-nucleotide producing bacteria
- Low cost industrial manufacture of 5'-nucleotides useful as
medicaments and condiments.

IW - MICROBIOLOGICAL FERMENTATION

IKW - MICROBIOLOGICAL FERMENTATION

NC - 001

OPD - 1961-12-04

ORD - 1900-00-00

PAW - (KYOW) KYOWA FERMENT IND LTD

TI - 5-nucleotides by microbiological fermentation

XP-002186922

36 H 3
(16 E 611.2)
(16 E 461)

特 許 公 報
特 許 公 報

特許出願公告
昭40-24515
公告 昭40.10.26
(全2頁)

発酵法による5'-ヌクレオチドの製造法

特 願 昭 36-43382
出 願 日 昭 36.12.4
発 明 者 中山清
相模原市上鶴間4900
同 奈良高
東京都世田谷区祖師ヶ谷2の353
同 三沢正愛
川崎市高石百合ヶ丘団地24の403
出 願 人 協和醸酵工業株式会社
東京都千代田区大手町1の4
代 表 者 加藤辨三郎
代 理 人 弁理士 近藤一祐

発明の詳細な説明

本発明は発酵法による5'-ヌクレオチドの製造法に関するもので、その目的とするところは工業的に安価に5'-ヌクレオチドを製造するにある。

本発明者等は調味料、医薬品その他、広い用途を持つ貴重な5'-ヌクレオチドの安価な工業的製造法につき、多年研究を重ねた結果、その関連物質であるヌクレオシドを生産する菌株に放射線照射、薬剤処理等の変異処理を施して、フォスファターゼ陰性(欠失若しくは微弱)にせしめた人工変異株が5'-ヌクレオチドを培地中に生成蓄積することを発見した。

本発明者等は種々の微生物変異株を多数検討した結果ヌクレオシド生産能を有する微生物菌株にしてフォスファターゼ生産能が欠失若しくは極めて微弱となつた変異株が、親株が生成するヌクレオシドに対応する5'-ヌクレオチドを培地中に生成蓄積することを発見し、本発明を完成するに至つたものである。フォスファターゼの試験には種々の方法があるが、本発明者等はバーバー及びクーパー等の方法(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー・アンド・バクテリオロジー・63巻、65頁(1951))を菌種により適宜改変して行つた。

その一般的な方法を説明すると、0.01%の濃度にフェノールフタレインジフォスフェートを含

む栄養寒天平板に試験菌株を植菌して、通常28~37℃で24~72時間培養後、該寒天平板をアンモニア蒸気に曝して、コロニーがフェノールフタレインの赤色を示すものをフォスファターゼ陽性株、変色なきものを陰性株(欠失若しくは微弱化株)と判定した。この方法で使用する試薬としてはフェノールフタレインジフォスフェートの代りにパラニトロフェニールフォスフェートを用いることも出来る。この場合にはフォスファターゼ陽性株のコロニーの着色は黄色であり、フォスファターゼ陰性株のコロニーは変色しない。このようにして見出された変異株はフォスファターゼ生産能が極めて微弱又は欠失している。本発明に於て使用する菌株は上記の如くにして見出されたるヌクレオシド生産菌のフォスファターゼ陰性(欠失若しくは微弱化)人工変異株である。5'-ヌクレオチドを生成蓄積せしめるための培地成分としては糖質原料、有機酸、アミノ酸、その他の炭素源と、窒素源、磷源並びに無機塩及び菌株の生育に必要な生育因子を含有すると考えられるコンスチープリカー、酵母エキス、肉エキス、ペプトン等及び炭酸カルシウムを含有する菌の生育に必要な組成の培地を滅菌して種培地又は発酵培地とする。この種培地に先に説明した如き特徴をもつ5'-ヌクレオチド生産菌を接種して、種培養を通常25~37℃で約16~24時間振盪培養又は通気攪拌培養を行い、菌体の懸濁液をつくり、これを種菌液として発酵培地に接種して25~37℃で、約3日間振盪培養又は通気攪拌培養を行い、5'-ヌクレオチドを生成蓄積せしめ、然る後発酵完了液より菌体を分離し、その清澄液をイオン交換樹脂で処理し、比較的純粋な5'-ヌクレオチド含有液を分離し、この溶液を濃縮後アルコールを添加し又は添加せずして5'-ヌクレオチドを単離する。

実施例

マイクロコッカス・グルタミクスのイノシン生産菌株No.5324、エアロバクター・エアロゲネスのキサントシン生産菌株No.5302、サツカロミセス・セレビシエのイノシン生産菌株No.Y326及びこれらのヌクレオシド生産菌株を変異させて得たフォスファターゼ陰性(欠失若しくは微弱化)株を用い、此等の菌株をグルコース2%、ペプト

ン1%、酵母エキス1%、食塩0.25%の組成の種培地で28℃で24時間培養したものを発酵培地に対して10%（容量）の割合で植菌する。両培地とも250mlの三角フラスコに30ml宛分注し、殺菌後使用する。発酵すべき培地の組成は第一表の脚注に示したものを使用する。かくして72時間培養した発酵液中の5'-ヌクレオチドの生成量は第一表に示した如くであつた。フオ

スファターゼ陰性株の生産した5'-ヌクレオチドは、菌体を除去した発酵液をダウエックス-1（強塩基性イオン交換樹脂）クロライド型樹脂を通してイオン交換を行い、次に塩酸での溶出液を苛性ソーダで中和濃縮し、アルコールを添加して5'-ヌクレオチド（イノシン酸又はキサンチル酸）のソーダ塩を得た。

第 1 表
発酵培地 1 ml 当りの生成蓄積量

使用培地	使用菌種	ヌクレオチド	5'-ヌクレオチド
(1) ミクロコツカス・グルタミクス Na 5 3 2 4	フオスフ アターゼ 陽性株	5.2mg (イノシン)	0
(2) エアロバクター・エアロゲネス Na 5 3 0 2		5.8mg (キサントシン)	0
(3) サツカロミセス・セレビシエ Na Y 3 2 6		12.0mg (イノシン)	0
(1) ミクロコツカス・グルタミクス Na 5 3 2 4 9 1	フオスフ アターゼ 陰性変異 株	12.0mg (イノシン)	3.3mg (イノシン酸)
(2) エアロバクター・エアロゲネス Na 5 3 0 2 2 4		12.0mg (イノシン)	3.7mg (キサンチル酸)
(3) サツカロミセス・セレビシエ Na Y 3 2 6 1 5 1		12.0mg (イノシン)	6.3mg (イノシン酸)

(注) 発酵培地の組成は(1)、(2)、(3)の各場合について次の如くである。pHは何れも殺菌前7.3に調整する。

	(1)	(2)	(3)
グルコース	7.5(%)	—	5.0(%)
ラクトース	—	5.0(%)	—
NH ₄ Cl	1.2	1.0	1.0
K ₂ HPO ₄	0.4	0.4	0.4
KH ₂ PO ₄	0.2	0.2	0.2
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.1	0.1	0.1
酵母エキス	0.7	0.5	0.5
コーンスチープリカー	0.3	—	0.3
CaCO ₃	1.5	1.0	1.0

特許請求の範囲

1 ミクロコツカス・グルタミクス、エアロバクター・エアロゲネス、サツカロミセス・セレビシエに属するフオスファターゼ陰性（欠失若しくは

微弱化）の5'-ヌクレオチド生産菌を栄養培地に培養して培養中に5'-ヌクレオチドを生成蓄積せしめこれを採取することを特徴とする発酵法による5'-ヌクレオチドの製造法。